

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

| | |
|--|--|
| Date of mailing (day/month/year) 11 August 2000 (11.08.00) | |
| International application No. PCT/NL99/00806 | Applicant's or agent's file reference WO 800129-AI |
| International filing date (day/month/year) 24 December 1999 (24.12.99) | Priority date (day/month/year) 24 December 1998 (24.12.98) |
| Applicant KOENDERMAN, Leendert et al | |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
17 July 2000 (17.07.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

| | |
|--|--|
| <p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p> | <p>Authorized officer</p> <p>Juan Cruz</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p> |
|--|--|

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OTTEVANGERS, S., U.
Vereenigde
Nieuwe Parklaan 9
NL-2587 BN The Hague
PAYS-BAS

RECEIVED

WAT 100 100

TECH CENTER 1600 2500

| | |
|---|---|
| Date of mailing (day/month/year) 17 July 2001 (17.07.01) | |
| Applicant's or agent's file reference P48044PC00 | IMPORTANT NOTIFICATION |
| International application No. PCT/NL99/00807 | International filing date (day/month/year) 27 December 1999 (27.12.99) |

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☐ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

Name and Address

INTROGENE B.V.
Wassenaarseweg 72
NL-2333 AL Leiden
Netherlands

State of Nationality

NL

State of Residence

NL

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person
 ☐ the name
 ☐ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

Name and Address

CRUCCELL HOLLAND B.V.
Archimedesweg 4
NL-2333 CN Leiden
Netherlands

State of Nationality

NL

State of Residence

NL

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

A power of attorney signed on behalf of the person appearing in Box 2 above is required.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
 ☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority
 ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority
 ☐ other:

| | |
|---|--|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer R. Chrem Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|---|--|

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

| | | |
|--|---|--|
| Applicant's or agent's file reference WO 800129-A1 | FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below. | |
| International application No. PCT/NL 99/00806 | International filing date (day/month/year) 24/12/1999 | (Earliest) Priority Date (day/month/year) 24/12/1998 |
| Applicant GLAXOWELLCOME B.V. et al. | | |

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 2 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item:

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box I).

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box II).

4. With regard to the title,

☐ the text is approved as submitted by the applicant.

☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

DETECTION OF PREACTIVATED PHAGOCYTES

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No

PCT/NL 99/00806

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/569 A61K39/00 C07K16/28 G01N33/50 C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N A61K C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X ✓ | EP 0 325 489 A (BECTON DICKINSON AND COMPANY) 26 July 1989 (1989-07-26) claim 3 | 5 |
| X | US 5 474 771 A (S. LEDERMAN ET AL.) 12 December 1995 (1995-12-12) claim 12 | 4 |
| A ✓ | EP 0 159 653 A (S.A. INNOVI N.V.) 30 October 1985 (1985-10-30) page 4, line 10-13; example 8 | 1-13 |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 May 2000

Date of mailing of the international search report

24/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/NL 99/00806

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 325489 A | 26-07-1989 | AT 100491 T | 15-02-1994 |
| | | DE 68912353 D | 03-03-1994 |
| | | DE 68912353 T | 23-06-1994 |
| | | ES 2061965 T | 16-12-1994 |
| | | JP 2016978 A | 19-01-1990 |
| | | JP 2059182 C | 10-06-1996 |
| | | JP 7095945 B | 18-10-1995 |
| US 5474771 A | 12-12-1995 | AU 675922 B | 27-02-1997 |
| | | AU 3141993 A | 15-06-1993 |
| | | CA 2123224 A | 27-05-1993 |
| | | EP 0614374 A | 14-09-1994 |
| | | JP 7505761 T | 29-06-1995 |
| | | WO 9309812 A | 27-05-1993 |
| | | US 5993816 A | 30-11-1999 |
| EP 159653 A | 30-10-1985 | NL 8401221 A | 18-11-1985 |
| | | AT 56750 T | 15-10-1990 |
| | | DE 3579731 D | 25-10-1990 |
| | | IL 74904 A | 28-09-1989 |
| | | JP 60256377 A | 18-12-1985 |
| | | US 4737455 A | 12-04-1988 |

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

RECORD COPY

For receiving Office use only

| | |
|---|-----------------|
| PCT/NL 99/00806 | |
| International Application No. | |
| 24 DEC 1999 | 24.12.99 |
| International Filing Date | |
| BUREAU VOOR DE INDUSTRIËLE EIGENDOM P.C.T. INTERNATIONAL APPLICATION | |
| Name of receiving Office and "PCT International Application" | |
| Applicant's or agent's file reference (if desired) (12 characters maximum) WO 800129-AI | |

Box No. I TITLE OF INVENTION

Antigen of a phagocyte, a phagocyte-recognizing agent, and a method of detecting a preactivated phagocyte

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

GlaxoWellcome B.V.
Huis ter Heideweg 62
NL-3705 LZ ZEIST
the Netherlands

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

+31 - 30 693 83 31

Facsimile No.

+31 - 30 693 84 33

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:
NL

State (that is, country) of residence
NL

This person is applicant
for the purposes of:

☐ all designated
States

☒ all designated States except
the United States of America

☐ the United States
of America only

☐ the States indicated in
the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

KOENDERMAN, Leendert
Vogelwikke 17
NL-3738 TT MAARTENSDIJK
the Netherlands

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box
is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
NL

State (that is, country) of residence:
NL

This person is applicant
for the purposes of:

☐ all designated
States

☐ all designated States except
the United States of America

☒ the United States
of America only

☐ the States indicated in
the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

ALTENBURG, Bernardus Stephanus Franciscus et al.
OCTROOIBUREAU LOS EN STIGTER B.V.
Weteringschans 96
NL-1017 XS AMSTERDAM
the Netherlands

Telephone No.

+31 - 20 623 68 32

Facsimile No.

+31 - 20 626 00 07

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box N. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

LOGTENBERG, Ton
Dorpstraat 19
NL-3433 CH VREESWIJK
the Netherlands

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
NL

State (that is, country) of residence:
NL

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

RAAIJMAKERS, Johannes Antonius Maria
Amaliastein 16
NL-4133 HC VIANEN
the Netherlands

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
NL

State (that is, country) of residence:
NL

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) *(mark the applicable check-boxes; at least one must be marked)*.

Regional Patent

- ☒ **AP** ARIPO Patent: ~~GH~~Ghana, ~~GM~~Gambia, ~~KE~~Kenya, ~~LS~~Lesotho, ~~MW~~Malawi, ~~SD~~Sudan, ~~SL~~Sierra Leone, ~~SZ~~Swaziland, ~~UG~~Uganda, ~~ZW~~Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA** Eurasian Patent: ~~AM~~Armenia, ~~AZ~~Azerbaijan, ~~BY~~Belarus, ~~KG~~Kyrgyzstan, ~~KZ~~Kazakhstan, ~~MD~~Republic of Moldova, ~~RU~~Russian Federation, ~~TJ~~Tajikistan, ~~TM~~Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP** European Patent: ~~AT~~Austria, ~~BE~~Belgium, ~~CH~~ and ~~LI~~Switzerland and Liechtenstein, ~~CY~~Cyprus, ~~DE~~Germany, ~~DK~~Denmark, ~~ES~~Spain, ~~FI~~Finland, ~~FR~~France, ~~GB~~United Kingdom, ~~GR~~Greece, ~~IE~~Ireland, ~~IT~~Italy, ~~LU~~Luxembourg, ~~MC~~Monaco, ~~NL~~Netherlands, ~~PT~~Portugal, ~~SE~~Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA** OAPI Patent: ~~BF~~Burkina Faso, ~~BJ~~Benin, ~~CF~~Central African Republic, ~~CG~~Congo, ~~CI~~Côte d'Ivoire, ~~CM~~Cameroon, ~~GA~~Gabon, ~~GN~~Guinea, ~~GW~~Guinea-Bissau, ~~ML~~Mali, ~~MR~~Mauritania, ~~NE~~Niger, ~~SN~~Senegal, ~~TD~~Chad, ~~TG~~Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the (PCT) *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)*

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

- | | |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE United Arab Emirates | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN India | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | <input checked="" type="checkbox"/> ZA South Africa |
| | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea | Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet: |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | <input type="checkbox"/> |

Precautionary Designation Statement In addition to the designations made above the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

| Box No. VI PRIORITY CLAIM | | <input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box. | | |
|---|-------------------------------|---|---------------------------------------|---|
| Filing date of earlier application (day/month/year) | Number of earlier application | Where earlier application is: | | |
| | | national application: country | regional application: regional Office | international application: receiving Office |
| item (1) (24.12.98) 24 December 1998 | 1010893 | NL | | |
| item (2) (19.02.99) 19 February 1999 | 1011341 | NL | | |
| item (3) | | | | |

☒ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): **1 and 2**

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA)
(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year)

Number

Country (or regional Office)

ISA /

Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains the following number of sheets:

request : 4

description (excluding sequence listing part) : 12

claims : 2

abstract : 1

drawings : 7

sequence listing part of description :

Total number of sheets : 26

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

1. ☒ fee calculation sheet
2. ☐ separate signed power of attorney
3. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:
4. ☐ statement explaining lack of signature
5. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
6. ☐ translation of international application into (language):
7. ☒ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
8. ☐ nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
9. ☒ other (specify): Copy of Search Report

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application: Dutch

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Amsterdam, 22 December 1999

ALTENBURG, Bernardus Stephanus Franciscus et al.

| | | |
|---|--|---|
| For receiving Office use only | | 2. Drawings: <input checked="" type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received: |
| 1. Date of actual receipt of the purported international application: | 24 DEC 1999 24.12.99 | |
| 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application: | | |
| 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2): | | |
| 5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / | 6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid. | |

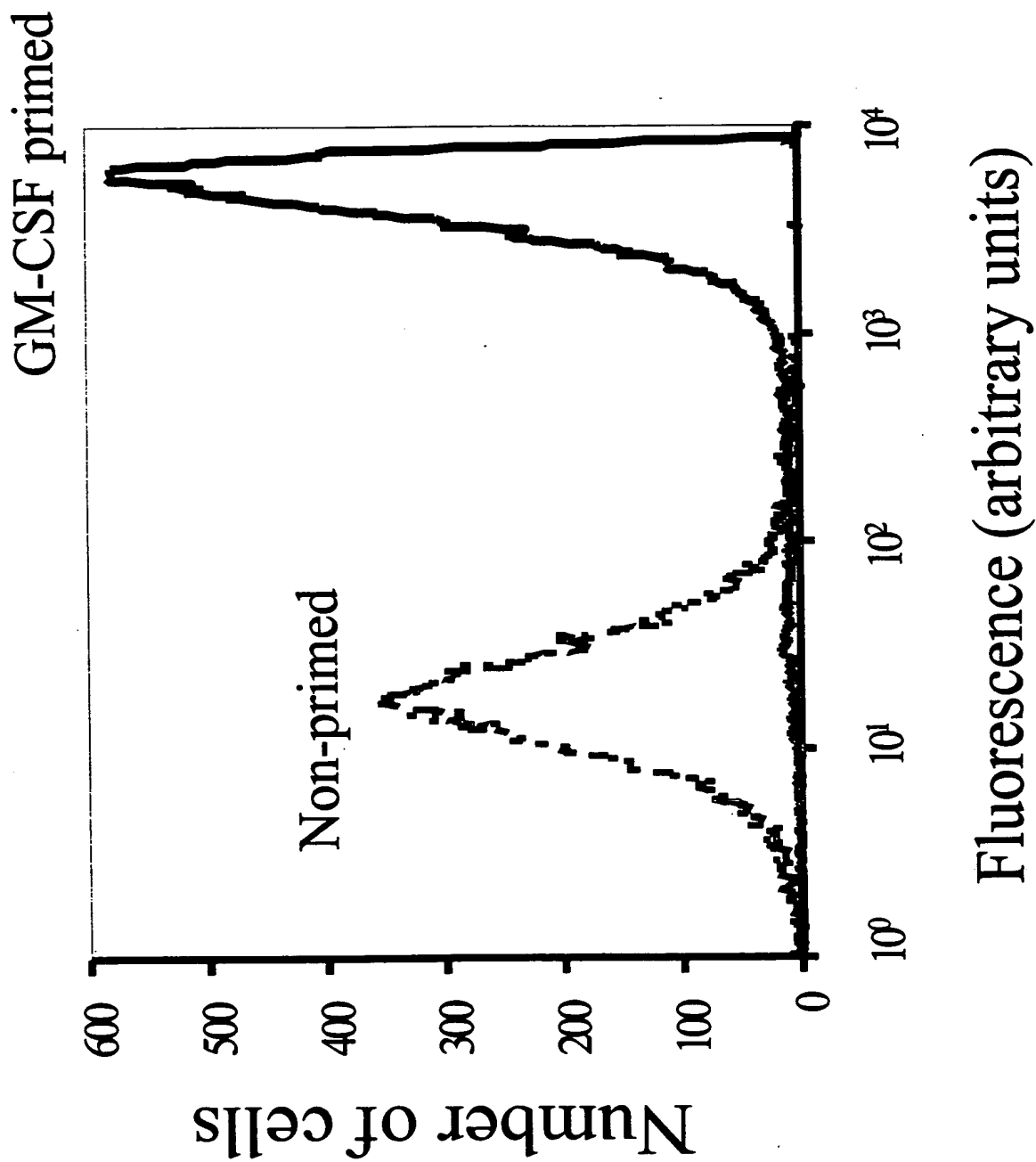
| | |
|---|----------------------------------|
| For International Bureau use only | |
| Date of receipt of the record copy by the International Bureau: | 02 FEBRUARY 2000 (02.02.00) |

1/7

27.03.00

CT/NL 99/00806

Fig. 1



2/7

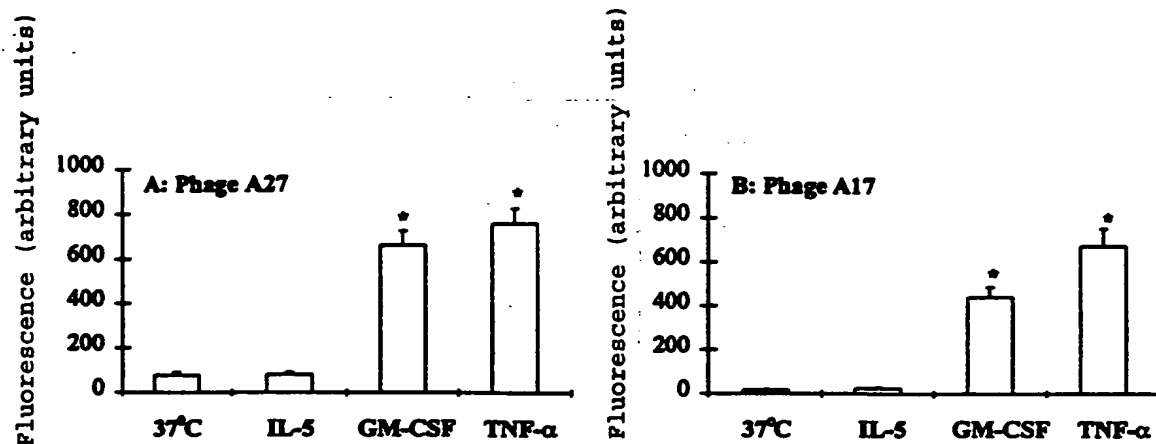


Fig. 2

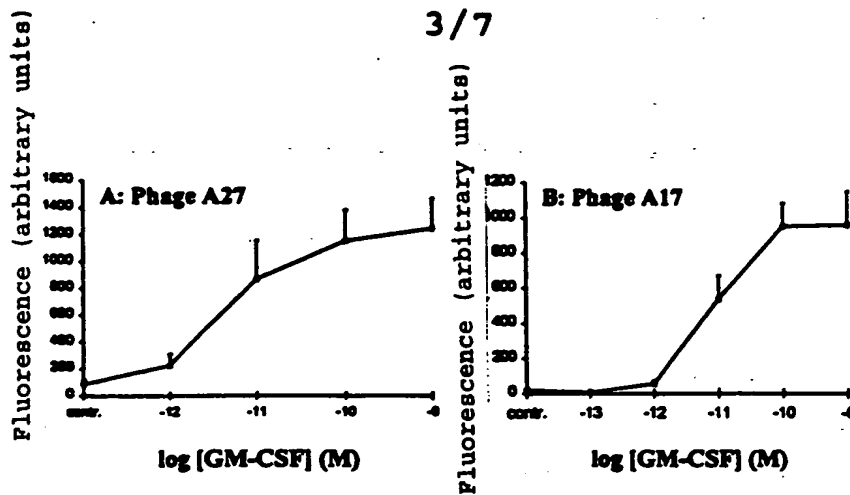


Fig. 3

4/7

27.03.00

PCT/NL 99/00806

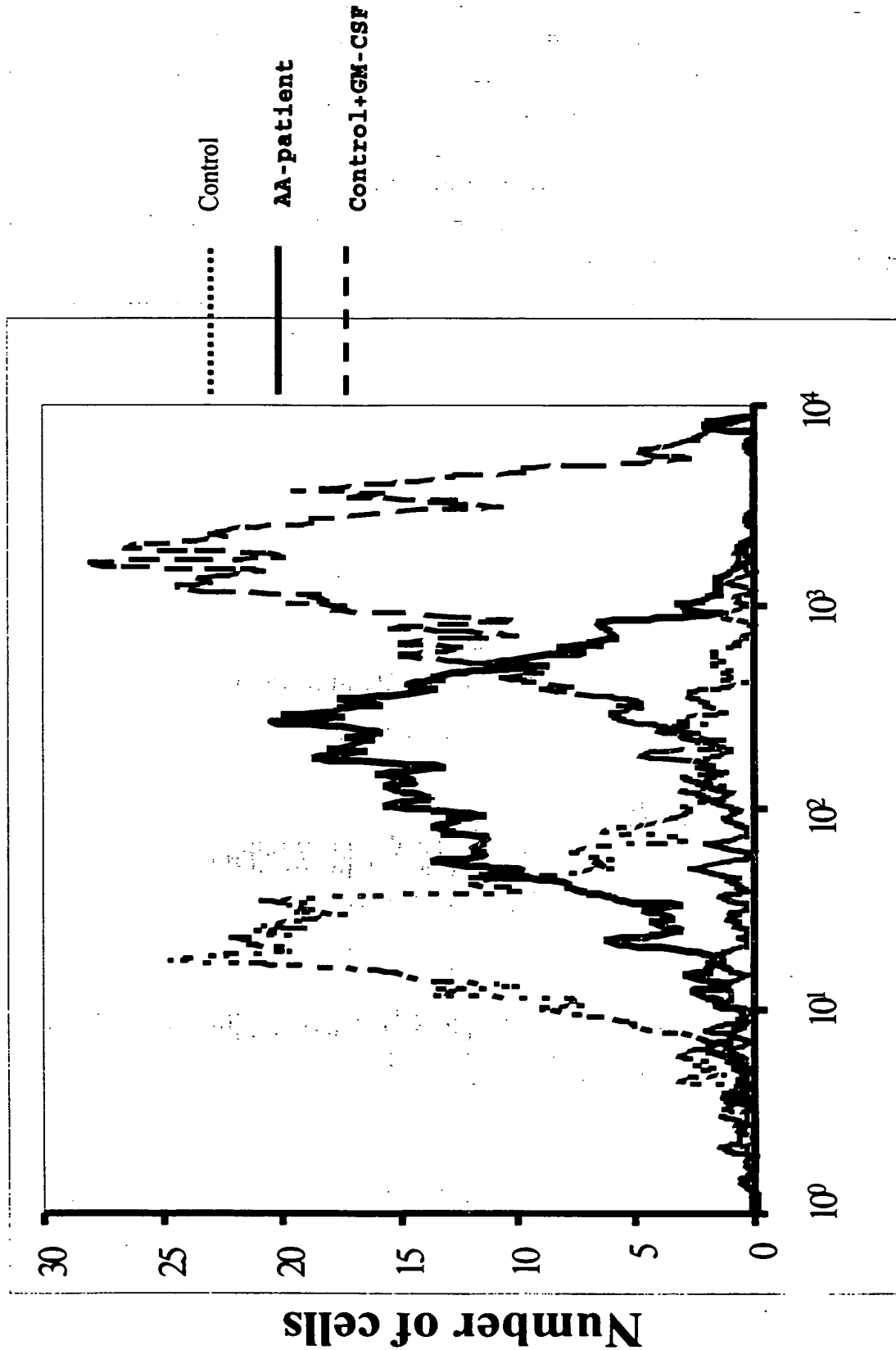


Fig. 4

Fluorescence (arbitrary units)

No Direct Effect of Steroids on expression of epitopes recognized by MoPhabs

- Cultured stem cells
- \pm Incubation steroid

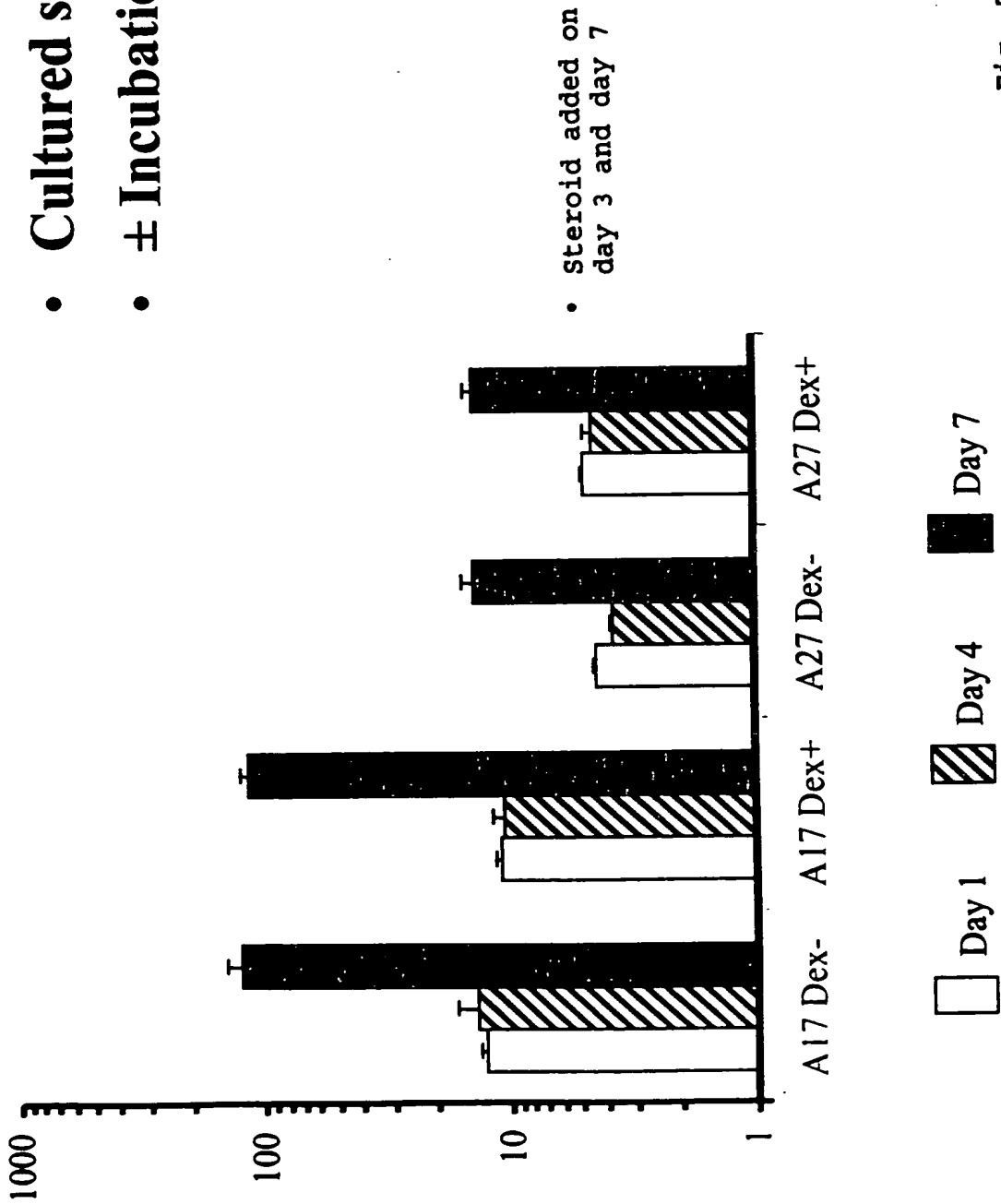


Fig. 5

6/7

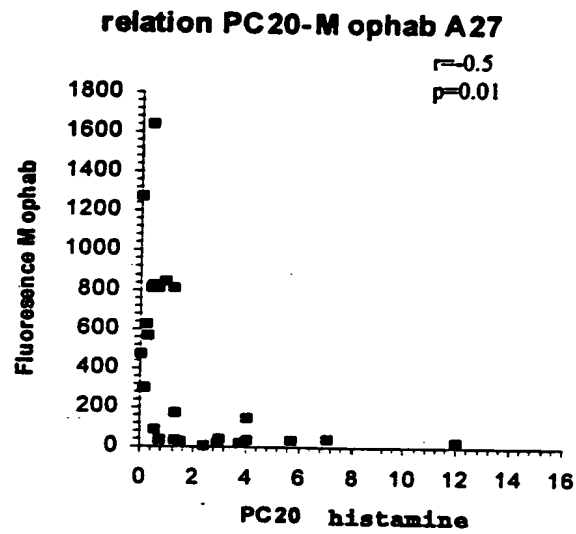


Fig. 6

Immunoprecipitation of the priming epitopes by A17 and A27 antibody constructs

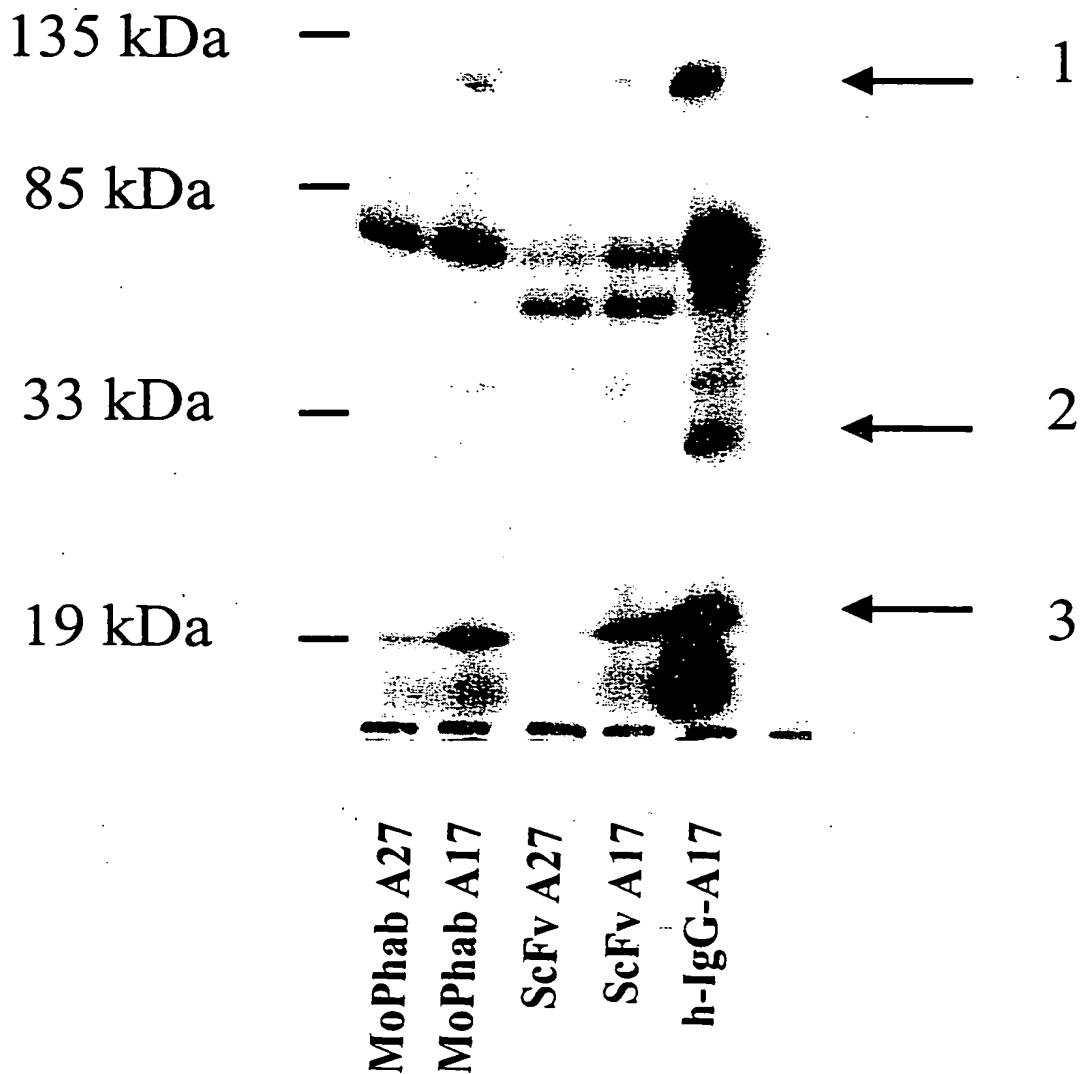


Fig. 7

WO 800129-A1/ho

Antigeen van een fagocyt, een fagocyt-herkennend agens, en een werkwijze voor het detecteren van een gepreactiveerde fagocyt

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een antigeen van een fagocyt.

Chronische ontstekingsziekten, zoals bijvoorbeeld allergische astma en reumatoïde arthritis, worden gemedieerd door ontstekingscellen zoals T-cellen en fagocyten. Op de plaats van een ontsteking in een orgaan worden cytokinen gevormd. Een deel van de cytokinen diffundeert naar het perifere bloed waar ze betrokken zijn bij de mobilisatie van nieuwe ontstekingscellen. Deze ontstekingscellen worden door interactie met een cytokine gepreactiveerd. De mate van preactivatie van fagocyten correleert met de hoeveelheid ontsteking bevorderende cytokinen en daarmee met de uitgebreidheid van de ontstekingsreactie. Met name voor ziekten gelocaliseerd in organen zoals de long en darm (bijvoorbeeld bij de ziekte van Crohn) is het fysiek zeer lastig of onmogelijk om zonder invasief onderzoek de ernst van een ontsteking betrouwbaar vast te stellen. Daarenboven geeft invasief onderzoek in de vorm van een biopt alleen informatie over de stand van zaken in het biopt zelf. Het betrouwbaar vaststellen van de ernst van een ontsteking is met name daarom lastig aangezien tot op heden geen voor een gepreactiveerde fagocyt specifiek antigeen is gevonden.

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een antigeen van een fagocyt, waarbij het antigeen kan worden herkend door ten minste een bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en 101482.

Gevonden is dat het aldus gekarakteriseerde antigeen, dat aanwezig is op het oppervlak van een fagocyt, specifiek is voor een gepreactiveerde fagocyt. Door het vaststellen van de aanwezigheid van het antigeen en in het bijzonder de hoeveelheid daarvan kan de aanwezigheid van een ontsteking en de ernst daarvan worden vastgesteld. Ten minste ten dele gezuiverd antigeen, of een fragment daarvan, kan

worden gebruikt voor het verkrijgen van gepreactiveerde fagocyt-herkennende agentia.

De uitvinding heeft tevens betrekking op een fagocyt-herkennend agens dat het antigeen herkent dat door ten
5 minste een bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en 101482 wordt herkend.

Een dergelijk agens, bijvoorbeeld een (monoclonaal) antilichaam, is zeer bruikbaar voor het vaststellen van de
10 aanwezigheid van een (orgaangebonden) ontsteking en de ernst daarvan. Daarenboven kan het agens worden gebruikt voor het elimineren van gepreactiveerde fagocyten uit bloed, bijvoorbeeld door middel van een aan een drager gebonden agens waarbij na contact tussen drager en bloed deze van elkaar worden
15 gescheiden.

In plaats daarvan kan ook worden gekozen voor het combineren van het agens met een groep die de (gepreactiveerde) fagocyt deactiveert of zelfs doodt. Hierbij kan worden
gedacht aan een antilichaam voorzien van een celdodende
20 eenheid, zoals een RicineB-keten, of aan een bi-specifiek antilichaam dat het immuunsysteem ertoe aanzet de gepreactiveerde fagocyt te elimineren. De groep is derhalve (chemisch) aan het agens gekoppeld of maakt daar deel van uit, bijvoorbeeld doordat het met behulp van genetische manipulatie is
25 gemaakt. Zowel chemische koppeling als genetische manipulatie zijn in het vak welbekende technieken.

De uitvinding heeft derhalve verder betrekking op een farmaceutisch preparaat dat een fagocyt-herkennend deactiverend agens bevat tezamen met een farmaceutisch aanvaardbare vulstof of drager.
30

In het licht van de eerstgenoemde toepassing, het vaststellen van een ontsteking, heeft de uitvinding tevens betrekking op een werkwijze voor het detecteren van een gepreactiveerde fagocyt, waarmee een gepreactiveerde fagocyt
35 specifiek kan worden gedetecteerd.

Hiertoe wordt de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding gekenmerkt doordat een fagocyt-herkennend agens in contact wordt gebracht met een fagocyt, en een tussen het fagocyt-herkennende agens en de fagocyt gevormd complex wordt

gedetecteerd.

Een dergelijke detectie van het gevormde complex kan op volgens een van een veelheid van in het vak bekende werkwijzen worden uitgevoerd. Zo kan het agens fluorescent zijn gelabeld en kan binding aan het oppervlak van de fagocyt met behulp van een fluorescentie microscoop of stromingscytometer (FACS) worden vastgesteld. Het label kan ook een enzym zijn, waarbij bijvoorbeeld het product van de door het enzym gekatalyseerde reactie wordt gedetecteerd. Daarbij kan als bepalingstechniek worden gedacht aan bijvoorbeeld een ELISA. Het gebruik van een enzym is met name interessant wanneer het agens een bacteriofaag is, aangezien de bacteriofaag kan zijn gerecombineerd om te coderen voor dit enzym. Het agens hoeft dan geen labeling te ondergaan.

Volgens een interessante uitvoeringsvorm is het agens in staat tot competitie met ten minste een bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en 101482, en een tussen het fagocyt-herkennende agens en de fagocyt gevormd complex wordt gedetecteerd.

Door de beschikbaarheid van de uit de voornoemde stammen te isoleren bacteriofagen, wordt het thans mogelijk gericht verdere fagocyt-herkennende agentia te zoeken aangezien de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding daar tevens een uitstekende test voor is. Dergelijke fagocyt-herkennende agentia kunnen bijvoorbeeld peptiden zijn, daaronder begrepen peptidomimetica en peptiden met ongebruikelijke aminozuren, of organische verbindingen die met behulp van *combinatorial chemistry* kunnen worden bereid. Het gebruik van een dergelijk fagocyt-herkennend agens, waartoe vanzelfsprekend ook de beide bacteriofagen worden gerekend zoals die uit de voornoemde stammen kunnen worden geïsoleerd, maakt het mogelijk van een fagocyt uit het bloed van een persoon of ander zoogdier vast te stellen of het een gepreactiveerde fagocyt is.

Volgens een gunstige uitvoeringsvorm is het agens een fluorescerend agens.

Aldus kan het gevormde complex gemakkelijk worden gedetecteerd, bijvoorbeeld met behulp van een fluorescentie

microscop.

Volgens een interessante uitvoeringsvorm omvat het agens in het zichtbaar licht fluorescerend eiwit dat daartoe hetzij geen prostetische groep behoeft, hetzij een prosteti-

5 sche groep vereist gekozen uit een in fysiologisch milieu aanwezig metaalion. Geschikt is het fluorescerende eiwit *Green of Blue Fluorescent Protein*.

Deze uitvoeringsvorm is met name dan interessant wanneer het agens een bacteriofaag is, aangezien de bacterio-

10 faag kan zijn gerecombineerd om te coderen voor dit fluorescente eiwit. Het agens hoeft dan geen labeling te ondergaan met een fluorescente stof.

Met voordeel geschiedt het detecteren met behulp van een *Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS)*.

15 Deze werkwijze maakt een snelle detectie en kwantificering van gepreactiveerde fagocyten mogelijk. Dit is bijvoorbeeld gunstig wanneer het belangrijk is dat snel inzicht wordt gekregen in de toestand van een patiënt, zoals bij septicische shock, maar ook bij het nalopen van een scala op

20 een fagocyt-herkende eigenschappen te onderzoeken verbindingen, bijvoorbeeld zoals die hiervoor zijn genoemd.

Volgens een alternatieve uitvoeringsvorm geschiedt het detecteren met behulp van een ELISA. Daarbij kan gebruik worden gemaakt van een (met een enzym gelabeld) antilichaam

25 tegen het fagocyt-herkende agens. Wederom kan het agens een fusie-eiwit zijn (of bevatten) dat het enzym omvat.

Deze werkwijze heeft als voordeel dat het een eventuele gepreactiveerde fagocyt bevattende monster niet vers hoeft te zijn. Ook met deze werkwijze is het mogelijk een

30 zeer groot aantal verbindingen op hun fagocyt-herkende activiteit na te lopen.

De onderhavige uitvinding is in het bijzonder geschikt voor het detecteren van een gepreactiveerde fagocyt, waarbij die fagocyt afkomstig is van een persoon waarvan

35 wordt gedacht dat die lijdt aan een aandoening gekozen uit de groep bestaande uit i) orgaangebonden onstekingsziekten, zoals inflammatoire longziekten (bijvoorbeeld allergische astma, COPD, en cysteuze fibrose) en darmziekten (bijvoorbeeld Colitis ulcerosa, en de ziekte van Crohn); ii) septicische

shock; iii) allergieën; en iv) auto-immuunziekten (bijvoorbeeld rheumatoïde arthritis); alsmede van traumapatiënt (bijvoorbeeld vroege detectie van ARDS); of een van persoon die een transplantatie heeft ondergaan (vroege detectie van afstoting).

Aanvraagster sluit niet uit dat de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding gebruikt kan worden om van één of meer vormen van *Repetitive Strain Injury* objectief vast te stellen en mogelijk te kwantificeren. In het laatste geval zou het effect kunnen worden gemeten van een behandeling, bijvoorbeeld met corticosteroiden of door fysiotherapie.

Met voordeel wordt voor de detectie bloed van een persoon gelyseerd met isotone, koude NH_4Cl -oplossing onder oplevering van een fagocytbevattende oplossing.

Aldus kan zeer snel een voor de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding geschikte fagocyt-bevattende oplossing worden bereid, waarin eventueel aanwezige gepreactiveerde fagocyten kunnen worden gedetecteerd.

De onderhavige uitvinding zal thans worden toegelicht aan de hand van het volgende uitvoeringsvoorbeeld, waarbij

Fig. 1 het specifiek geprimeerde neutrofiele granulocyten herkende karakter van een agens volgens de uitvinding laat zien;

Fig. 2 laat zien dat dit onafhankelijk van de wijze van *primen* geschiedt;

Fig. 3 de dosis-afhankelijkheid van *primen* met GM-CSF laat zien;

Fig. 4 laat zien dat het door een agens volgens de uitvinding herkende epitoom in verhoogde mate aanwezig is op eosinofiele granulocyten verkregen van een patiënt met symptomatisch allergische astma;

Fig. 5 laat de afwezigheid zien van een effect van een voor behandeling van astma gebruikt geneesmiddel op de expressie van het antigeen;

Fig. 6 laat de relatie zien tussen de bronchiale hyperreactiviteit bij patiënten met allergische astma en expressie van het antigeen volgens de uitvinding op eosinofiele granulocyten; en

Fig. 7 een autoradiogram voorstelt van een immuun-precipitaat dat antigeen volgens de uitvinding bevat.

1) FAAGBIBLIOTHEEK MET ANTILICHAAMFRAGMENTEN OP HET
5 OPPERVLAK VAN DE FAGEN.

Door middel van de "phage display"-technologie kunnen eiwitten op de mantel van bacteriophagen tot expressie worden gebracht. In het onderhavige geval is een stukje DNA dat codeert voor een deel van een antilichaam-molecuul door
10 middel van een recombinant DNA-technologie in hetzelfde leesraam gebracht als het DNA dat codeert voor bacteriofaag g3p-manteleiwit. Hierdoor ontstaat een g3p-omvattend fusie-eiwit. In een bibliotheek van dergelijke bacteriofagen bezitten de fagen elk een andere antilichaamsspecificiteit. Daartoe wordt
15 bij een groot aantal fagen het voor antilichaam coderende DNA uit B-lymfocyten gebruikt. Voor de onderhavige uitvinding is gebruik gemaakt van de "Phage-antibody library" beschreven door De Kruif et al. (ref. 1) en de Amerikaanse octrooiaanvraag met nr. 09/085.072 waarvan de beschrijving hierin door
20 verwijzing is opgenomen.

In het kort werden gedegenereerde oligonucleotiden gebruikt om kunstmatige CDR3-gebieden met een lengte van 6 tot 15 nucleotiden toe te voegen aan een verzameling van 49 vooraf gekloneerde kiemlijn VH-genen. Vervolgens werden deze
25 in vitro "geherrangschikte" VH-genen in een verzameling van PHEN1 van fagemid-afgeleide vectoren gekloneerd die zeven verschillende lichte keten V-gebieden bevatten, gefuseerd in een leesraam van het gen dat codeert voor het phage minor capsid protein-gen III. Het met behulp van een helperfaag
30 (VCSM13, cat. no. 200251, Stratagene) bijvoorbeeld in E. coli XL-1 bacteriën (Stratagene) brengen van deze constructen leidt tot de expressie van single chain FV-antilichaamfragmenten als gen III fusie-eiwitten op het oppervlak van de bacteriofaag.

35 Er werd een phagemid bibliotheek verkregen van $1,2 \times 10^8$ klonen.

2) VERRIJKING VAN FAGEN VOOR GEPREACTIVEERDE FAGEN
FAGOCYTEN SPECIFIEKE BACTERIOFAGEN EN CLONERING.

Ongeprimeerde leukocyten werden volgens een algemeen

bekende techniek onder gebruikmaking van isotone lysis met behulp van een isotone, koude NH_4Cl oplossing geïsoleerd. Hierbij is het uitermate belangrijk contaminatie met lipopolysacharide (LPS) te vermijden door LPS-vrije media te gebruiken, aangezien LPS kunstmatig kan primen waardoor de werkwijze niet met succes kan worden uitgevoerd. Een deel (10^8) van de ongeprimeerde leukocyten-populatie werd in contact gebracht met de bacteriofaag bibliotheek (10^{11} bacteriofagen). Na 30 minuten werden de leukocyten afgedraaid (voorklaring) en niet verder gebruikt. In het supernatant blijven die bacteriofagen over die niet-geprimeerde leukocyten niet herkennen. Vervolgens werd een ander deel van de leukocytenpopulatie geprimeerd met granulocyt macrofaag-kolonie stimulerende factor GM-CSF (100 pM, 30 min., 37°C) en vervolgens in contact gebracht met het hiervoor verkregen bacteriofagen-bevattende supernatant. Nu binden de gezochte bacteriofagen aan de leukocyten. De leukocyten werden gewassen en bacteriofagen die aan de geprimeerde cellen bonden werden gevisualiseerd met een tweestapskleuring. Eerst werden de cellen in contact gebracht met een polyclonale antistof die de bacteriofagen herkent (anti-M13). Vervolgens werd een met phyco-erythrine-gelabelde antilichaam tegen het anti-M13 polyclonaal gebruikt om de cellen die bacteriofagen hebben gebonden met behulp van een FACS te visualiseren. De FACS was voorzien van een cel-sorteerinrichting en die leukocyten werden geïsoleerd die voldeden aan de volgende eis: Fluorescerende geprimeerde eosinofiele granulocyten (zie ref. 2). De bacteriofagen werden van de gesorteerde geprimeerde eosinofiele granulocyten (een subklasse van leukocyten) geëluëerd en zoals hiervoor beschreven vermeerderd. Deze werkwijze (voorklaring tot en met elutie en vermeerderen) werd drie keer herhaald waardoor steeds zuiverder bacteriofaag suspensies werden verkregen. Vervolgens werden 200 bacteriofaag klonen vermeerderd en met behulp van de volgende werkwijze en onder gebruikmaking van de FACS beoordeeld.

SELECTIE VAN VOOR GEPREACTIVEERDE FAGOCYTEN-SPECIEFIEKE BACTERIOFAGEN

Ongeprimeerde leukocyten werden geïsoleerd als beschreven onder 2. Een tweede deel van de leukocyten werd be-

handeld met GM-CSF en fluorescent groen gelabeld met sulfido-
fluoresceïne diacetaat (SFDA, voor labeling procedure zie
ref. 3). Hierna werden de geprimeerde fluorescent leukocyten
gemengd met ongekleurde ongeprimeerde cellen in een verhouding
5 1:1. Vervolgens werd deze gemengde celpopulatie in contact
gebracht met de verschillende bacteriofaag klonen. De klonen
van interesse moesten de volgende eigenschappen hebben: (i)
geen expressie op lymfocyten (rustend/geactiveerd), negatief
op rustende neutrofiele/eosinofiele granulocyten (herkenbaar
10 als niet groene granulocyten en de in ref. 2 voor eosinofiele
granulocyten genoemde gates), en positief op GM-CSF geprimeerde
granulocyten (herkenbaar als groene cellen in bovengenoemde
gates). Twee verschillende bacteriofaag klonen, zoals die
kunnen worden geïsoleerd uit de stammen A17 en A27 met aan-
15 winstnummers CBS 101481, respectievelijk 101482, vertoonden
deze karakteristieken. Het deponeren van de stammen geschied-
de op 1 december 1998 bij het CBS (Centraalbureau voor Schim-
melcultures, Postbus 273, 3740 AG, Baarn).

Uit fig. 1 blijkt dat bacteriofaag A17 met GM-CSF
20 geprimeerde neutrofiele granulocyten herkent, terwijl het niet-
geprimeerde neutrofiele granulocyten niet herkent. In het kort:
Volbloed werd gepreïncubeerd met buffer of met GM-CSF (10 pM)
gedurende 15 min. bij 37°C. Hierna werden de rode bloedcellen
gelyseerd met ijskoude NH₄Cl-oplossing. Vervolgens werden de
25 witte bloedcellen gewassen en gekleurd met de bacteriofaag
A17 en geanalyseerd met een stromingscytometer. De neutrofie-
le granulocyten werden geïdentificeerd via hun unieke voor-
waartse en zijwaartse lichtverstrooiingskarakteristieken. Het
getoonde experiment is representatief voor 25 verschillende
30 experimenten.

Fig. 2 laat de relatieve fluorescentie-intensiteit
zien van ongeprimeerde neutrofiele granulocyten en met GM-CSF
(100 pM, 30 min., 37°C) of TNF α (100 IU/ml; 20 min.; 37°C)
geprimeerde neutrofiele granulocyten. Duidelijk blijkt dat
35 beide wijzen van *primen* resulteren in een grotere aanwezig-
heid van het door bacteriofaag A27 herkende epitoom. In het
kort: Volbloed werd behandeld met GM-CSF (100 pM), TNF α
(100 IU/ml), IL-5 (100 pM) of buffer gedurende 15 min. bij
37°C. Vervolgens werden de rode cellen gelyseerd (met ijskou-

de NH_4Cl oplossing), en er werd zoals hierboven beschreven gewassen en gekleurd met A27(A) en A17(B). De waarden zijn weergegeven als gemiddelden \pm SE (n=24). Waarden aangegeven met * zijn significant verschillend van de buffercontrole (p<0.001). Vergelijkbare resultaten werden verkregen voor humane monocysten (resultaten niet weergegeven).

Fig. 3 geeft de dosis-afhankelijkheid voor de bacteriofaagstammen A17 en A27 van primen met GM-CSF weer. In het kort: Volbloed werd behandeld met verschillende concentraties GM-CSF of buffer gedurende 15 min. bij 37°C. Vervolgens werden de rode cellen gelyseerd (met ijsskoude NH_4Cl oplossing), en er werd zoals hierboven beschreven gewassen en gekleurd met A27(A) en A17(B). De waarden zijn weergegeven als gemiddelden \pm SE (n=10).

Fig. 4 laat zien dat het door bacteriofaag A17 herkende epitoom in verhoogde mate aanwezig is op eosinofiele granulocyten verkregen van een patiënt met symptomatisch allergisch astma. Dit experiment laat zien dat eosinofiele granulocyten in het bloed van symptomatisch astma patiënten een gepreactiveerd fenotype bezitten. De data van de patiëntcellen werden vergeleken met cellen uit het bloed (verkregen op dezelfde dag) van een normale donor voor en na behandeling in vitro met GM-CSF (100 pM). Het afgebeelde experiment is representatief voor ten minste 15 additionele experimenten. Vergelijkbare resultaten werden verkregen voor COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, a smoking-related respiratory disease.) Bij COPD zijn het met name de neutrofiele granulocyten die hoge expressie van het antigeen vertonen, terwijl bij astma de eosinofiele granulocyten een hoofdrol spelen. (Resultaten niet weergegeven.)

Fig. 5 laat zien hoe geschikt het antigeen volgens de uitvinding is: glucocorticosteroiden, zoals dexamethason of prednison, die voor de behandeling worden gebruikt hebben geen invloed op de (in vitro) expressie van het antigeen. Dat wil zeggen dat verlaging van de expressie in vivo het gevolg is van de onderdrukking van de ontsteking. In het kort: Stamcellen werden verkregen uit navelstrengbloed en in kweek gezet onder omstandigheden die leiden tot de terminale differentiatie tot neutrofiele granulocyten. Deze zijn door in het

medium aanwezige cytokines, nodig voor het differentiëren, geprimed. Toevoeging van dexamethason ($1 \mu\text{M}$) aan de kweek had geen invloed op de expressie van het antigeen.

Fig. 6 laat de relatie zien tussen de bronchiale hyperreactiviteit en de expressie van het antigeen op eosine granulocyten zoals gemeten met A27. De meting van de bronchiale hyperreactiviteit geschiedt door een patiënt histamine (of een verbinding met een vergelijkbare werking) in te laten ademen en te meten bij welke concentratie (mg/ml) de longfunctie met 20% is teruggelopen. Deze meting is voor patiënten zeer belastend en kan bij bepaalde patiëntengroepen zoals bejaarden en heel kleine kinderen eigenlijk niet worden uitgevoerd. Uit fig. 6 blijkt dat er een uitstekende correlatie is tussen patiënten met een lage histaminedrempel en de expressie van het antigeen. Dit betekent dat een zwaarbelastende, langdurige test kan worden vervangen door een eenvoudige snelle meting aan een bloedmonster.

Bij COPD patiënten is tot op heden geen merker gevonden die correleert met de door de patiënt ervaren benauwdheid (Borg score). Het antigeen volgens de uitvinding herkend door bacteriofaag A27 geeft daarentegen een heel bruikbare correlatie met de Borg score ($r=0,65$, $p<0,001$. Resultaten niet weergegeven).

Fig. 7 laat een autoradiogram van een SDS-PAGE gel zien waarin specifiek herkend antigeen zichtbaar is. Geïsoleerde humane neutrofiele granulocyten die waren geprimed met FMLP (het tripeptide formyl-methionyl-leucyl-phenylalanide) werden aan het oppervlak gelabeld met ^{125}I (Iodogen methode). Vervolgens werden bacteriofaag A17 en A27 en constructen daarvan (ScFv fragmenten gemaakt volgens ref. 1 en gehumaniseerde antistof met de antigeenherkende sequenties van bacteriofaag A17 (ref. 4)) op ijs gedurende 90 min. in contact gebracht met de radioactief gelabelde granulocyten. Na wassen (2x) werden de gebonden bacteriofagen en constructen daarvan volgens het voorschrift van de fabrikant met BTSSP (Pierce, Rockford, IL) (reversibel) gecross-linked aan de granulocyten. Na lysis van de granulocyten werden een immunoprecipitatie (2-4 uur bij 4°C) uitgevoerd. Dit geschiedde voor de bacteriofagen met anti-M13 antilichamen (Pharmacia)

gebonden aan proteïne A-agarose. Voor de ScFv-fragmenten geschiedde dit met anti-myc antistoffen, en voor gehumaniseerd IgG direct met proteïne A-agarose. Er werd drie keer gewassen met lysis buffer. Door reductie werden de gecross-
5 linkte antistoffen en antigenen gescheiden en direct op een 10% SDS-PAA gel gebracht. Specifiek immuno-geprecipiteerde eiwitten zijn aangegeven met een pijl (De controle is niet weergegeven. Het belang van het gebruik van constructen naast bacteriofaag is dat in het bijzonder niet-bindende delen van
10 de antistoffen a-specifieke adsorptie vertonen. Door het gebruik van verschillende antistoffen, met verschillende niet-bindende delen, wordt het beter mogelijk onderscheid te maken tussen specifieke en eventueel toch aanwezige a-specifieke banden.

Referenties

- Ref. 1 De "Phage antibody library" die is gebruikt is beschreven door De Kruif en collega's (Kruif et al., 1995. Selection and application of human scFv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with "designed" CDR3 regions, J.Mol. Biol., 248, 97 - 105).
- 5
- Ref. 2 Mengelers, H.J.J., Maikoe, T., Brinkman, L., Hooibrink, B., Lammers, J.W.J. en Koenderman, L. (1994). Immunophenotype of eosinophils recovered from blood and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatics. Am. J. Respir. Crit. Care med. 149: 345 - 351).
- 10
- Ref. 3 Mengelers, H.J.J., Maikoe, T., Brinkman, L., Hooibrink, B., Lammers, J.W.J. en Koenderman, L. (1995). Cognate interaction between human lymphocytes and eosinophils is mediated by beta2-integrins and very late antigen-4. J. Lab. Clin. Med. 126: 261 - 268).
- 15
- Ref. 4 Huls et al. Nature Biotechnology, 17: blz. 276 - 281 (1999)).
- 20

De beschrijving van deze referenties is hierin door verwijzing opgenomen.

CONCLUSIES

1. Antigeen van een fagocyt, met het kenmerk, dat het antigeen kan worden herkend door ten minste een bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en 101482.

5 2. Fagocyt-herkennend agens, met het kenmerk, dat het fagocyt-herkennende agens het antigeen herkent dat door ten minste een bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en 101482 wordt herkend.

10 3. Fagocyt-herkennend agens volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat het een een groep met een fagocyt deactiverende activiteit bezit.

 4. Farmaceutisch preparaat dat een fagocyt-herkennend agens bevat tezamen met een farmaceutisch aanvaardbare
15 vulstof of drager.

 5. Werkwijze voor het detecteren van een geactiveerde fagocyt, met het kenmerk, dat een fagocyt-herkennend agens in contact wordt gebracht met een fagocyt, en een tussen het fagocyt-herkennende agens en de fagocyt gevormd complex wordt gedetecteerd.
20

 6. Werkwijze volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat het agens in staat is tot competitie met ten minste een bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en 101482, en een tussen het
25 fagocyt-herkennende agens en de fagocyt gevormd complex wordt gedetecteerd.

 7. Werkwijze volgens conclusie 6, met het kenmerk, dat het agens een bacteriofaag is.

 8. Werkwijze volgens conclusie 6 of 7, met het kenmerk, dat het agens een fluorescerend agens is.
30

 9. Werkwijze volgens conclusie 8, met het kenmerk, dat het agens *Green of Blue Fluorescent Protein* omvat.

 10. Werkwijze volgens conclusie 8 of 9, met het kenmerk, dat het detecteren geschiedt met behulp van een *Fluorescence-Activated Cell Sorter* (FACS).
35

 11. Werkwijze volgens één van de conclusies 5 tot 7,

met het kenmerk, dat het detecteren geschiedt met behulp van een ELISA.

12. Werkwijze volgens één van de conclusies 3 tot 11, met het kenmerk, dat de fagocyt afkomstig is van een
5 persoon waarvan wordt gedacht dat die lijdt aan een aandoening gekozen uit de groep bestaande uit i) orgaangebonden onstekingsziekten; ii) septische shock; iii) allergieën; en iv) auto-immuunziekten; of een van persoon die een transplantatie heeft ondergaan.

10 13. Werkwijze volgens conclusie 12, met het kenmerk, dat voor de detectie bloed van een persoon wordt gelyseerd met isotone, koude NH_4Cl -oplossing onder oplevering van een fagocytbevattende oplossing.

UITTREKSEL

De uitvinding heeft betrekking op een antigeen van
5 een fagocyt. Het antigeen volgens de uitvinding is specifiek
voor een gepreactiveerde fagocyt en kan worden herkend door
ten minste één bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd
uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en CBS 101482.
De uitvinding heeft tevens betrekking op een fagocyt-herken-
10 nend agens dat het voor een gepreactiveerde fagocyt specifieke
antigeen herkent, alsmede een farmaceutisch preparaat dat
een dergelijk agens bevat. Tenslotte heeft de uitvinding
betrekking op een werkwijze voor het detecteren van een
gepreactiveerde fagocyt onder gebruikmaking van een fagocyt-
15 herkendend agens volgens de uitvinding.